

## Mikrobiologisches Grundpraktikum (modul B.Bio 118) Einführung in die Benutzung des Lichtmikroskops

Die kurzen Filme erläutern die Verwendung eines einfachen Lichtmikroskops. Einige wichtige Grundlagen sind in dem begleitenden Text erläutert

### (1) Vergrößerung und Auflösung

Diese Größen bestimmen entscheidend die Leistungsfähigkeit des Lichtmikroskops. Sie lassen sich aus den Angaben ermitteln, die sich auf den Okularen und Objektiven befinden.

Okular:

<b>WF</b>	Okulartyp ("wide field")
<b>10 x</b>	Einzelvergrößerung des Okulars

Objektiv:

(Von den drei vorhandenen Objektiven wird im Praktikum meist nur das mit folgender Bezeichnung verwendet.)

<b>Ph 2</b>	Phasenkontrastobjektiv Zur Phasenkontrast-Mikroskopie (siehe unten) muss am Kondensator der entsprechende Phasenkontrastschieber eingerastet sein.
<b>Planachromat</b>	Typbezeichnung: achromatisches (farbkorrigiertes) und plankorrigiertes (verzeichnungsfreies) Standardobjektiv
<b>40/0.65</b>	Vergrößerung/numerische Apertur (n.A. <sub>Objektiv</sub> )

Kondensatorfrontlinse:

<b>0,9</b>	numerische Apertur des Kondensators (n.A. <sub>Kondensator</sub> )
------------	--

Aus den genannten Daten ergeben sich (rechnerisch) folgende Merkmale:

### Gesamtvergrößerung V

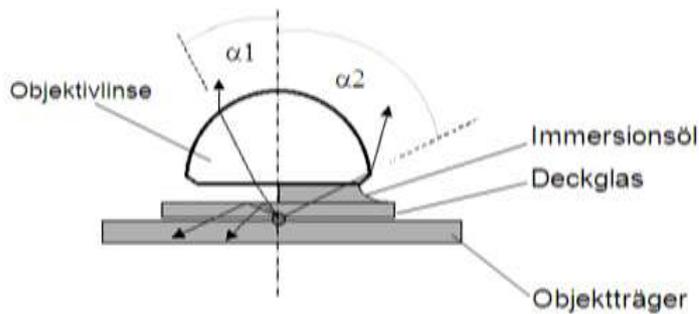
$$V = V_{\text{Okular}} \cdot V_{\text{Objektiv}} = 10 \cdot 40 = 400$$

**Wie groß würde bei einer solchen Vergrößerung ein Bakterium von 1 µm erscheinen?**

### Auflösung

Ein Objekt kann beliebig stark vergrößert werden, aber "förderlich" ist die Vergrößerung nur, wenn dabei auch weitere Objektdetails erkennbar werden, sonst ist die Vergrößerung "leer". Die Vergrößerung trifft also keine Aussage über das Auflösungsvermögen, d. h. die Grenze bei der kleine Objektdetails gerade noch unterscheidbar sind (z.B. zwei dicht beieinander liegende kleine Partikel, die gerade noch als einzelne Objekte unterschieden werden können). Für das Auflösungsvermögen ist die numerische Apertur (n.A.) des Objektivs entscheidend. Die n.A. ist der Sinuswert des halben Öffnungswinkels  $\alpha$ , multipliziert mit der Brechungszahl  $n$  des Mediums, das sich zwischen Deckglas und Objektiv-Frontlinse oder der Frontlinse des Kondensators und dem Objektträger befindet:

$$n.A. = n \cdot \sin \alpha$$



**Abb.:** Öffnungswinkel eines Objektivs bei einem Trockenobjekt (links,  $\alpha_1$ ) und einer Ölimmersion (rechts,  $\alpha_2$ )

Der Öffnungswinkel lässt sich durch verschiedenen Maßnahmen vergrößern, kann aber (für ein Objektiv) nicht größer als angenähert  $90^\circ$  sein. Luft zwischen dem Deckglas und dem Objektiv verhindert bei Objektiven mit hoher Apertur die Ausnutzung des maximal möglichen Öffnungswinkels, da bei einem Winkel von ca.  $42^\circ$  und größer an der Grenzfläche zwischen Glas und Luft Totalreflexion eintritt. Es können also Lichtwellen, die von dem Objekt mit einem großen Winkel gebeugt werden, nicht eingefangen werden. Gerade diese Beugungswinkel werden durch die feinen Objektdetails verursacht, es ist also entscheidend, diese Wellen durch das Objektiv einzufangen für die Darstellung der feinsten Objektdetails. Wird ein Öl (Immersionsöl) zwischen Deckglas und Frontlinse eingeführt, das den Brechungsindex von Glas hat, tritt die Totalreflexion nicht ein und auch die mit großem Winkel gebeugten Wellen können "eingefangen" werden. Die Verwendung von Öl ist jedoch nur sinnvoll bei hochaperturigen Objektiven. Für mittlere Auflösungen ist Öl wirkungslos.

Der kleinste noch auflösbare Abstand zweier Objektpunkte (Auflösungsgrenze) in einem Lichtmikroskop mit Linsenoptik lässt sich aufgrund der numerischen Aperturen von Objektiv und Kondensor berechnen:

$$d = \frac{\lambda}{n.A._{\text{Objektiv}} + n.A._{\text{Kondensor}}} = \frac{0,55 \mu\text{m}}{2 \cdot 0,65} = 0,42 \mu\text{m}$$

Für  $\lambda$  wurde hier mit  $0,55 \mu\text{m}$  die Wellenlänge des grünen Spektralbereichs eingesetzt. Für diesen Bereich sind allgemein auch die einfacheren Objektive (Achromate) korrigiert und haben hier ihre beste Leistung. Für die Summe der n.A. (eigentlich aus den n.A. von Objektiv und Kondensor) kann nicht mehr als der doppelte Objektivwert eingesetzt werden, also  $2 \cdot 0,65$ .

**Die hier angegebene numerische Apertur beträgt 0.65. Geben sie den entsprechenden Öffnungswinkel an.**

### Achtung!

> Objektstrukturen, die im Größenbereich der Auflösungsgrenze liegen, werden nicht objekt-ähnlich abgebildet. Vor allem die Form ist nicht mehr zu erkennen (kleine Partikel erscheinen alle rund).

> Die Grenze zwischen "förderlicher" und "leerer Vergrößerung" liegt im Bereich des 500- bis 1000-fachen der  $n.A._{\text{Objektiv}}$ :  $0,65 \cdot (500 \text{ bis } 1000) = 325 \text{ bis } 650$

### (3) Kontrast

Mikroorganismen sind meist ungefärbt und lichtdurchlässig; weder Lichtwellenlänge (Farbe) noch Amplitude (Intensität) werden merklich verändert. Die Objekte zeigen in Wasser deshalb kaum Kontrast und sind bei der Hellfeldmikroskopie nur schemenhaft erkennbar. Abhilfe kann eine (positive) **Kontrastfärbung** bringen. Schwerwiegende Nachteile einer Färbung sind: aufwändige Präparatvorbereitung und Möglichkeit der Artefaktbildung. Das Verhalten von lebenden Zellen kann nicht beobachtet werden.

Die Organismen sind allerdings optisch etwas dichter als die sie umgebende wässrige Lösung und bremsen daher das Licht beim Durchgang etwas ab. Dadurch kommt es zu einem Gang-(Phasen-)

unterschied zwischen den Lichtwellen, welche das Objekt durchlaufen und dem Licht, das durch das Objekt nicht beeinflusst wird. Dies kann zur Verbesserung des optischen Kontrasts ausgenutzt werden. Solche Veränderungen des Kontrasts werden durch Blenden erzielt, die unter der Kondensorlinse sitzen.



Abb.: Die halb geschlossene Kondensorblende im ausgebauten Kondensor. Der Hebel zur Einstellung der Irisblende zeigt nach unten. Die Kondensorlinse (links neben dem Kondensor) ist abgeschraubt.

Hier findet sich meist eine Kondensorblende (auch Aperturblende oder Kondensorblende). Sie ist eine variable Irisblende. Wird die Blende geschlossen (die Öffnung verkleinert), erhöht sich der Kontrast: Zellgrenzen und andere Konturen werden betont. Allerdings erhöht sich auch die Schärfentiefe, d.h. Objekte außerhalb der Focusebene werden sichtbar. Wird die Blende zu weit geschlossen, bilden sich Beugungssäume um die Konturen. Im Film ist an Hefezellen gezeigt, wie sich durch Öffnen und Schließen der Kontrast verändert.

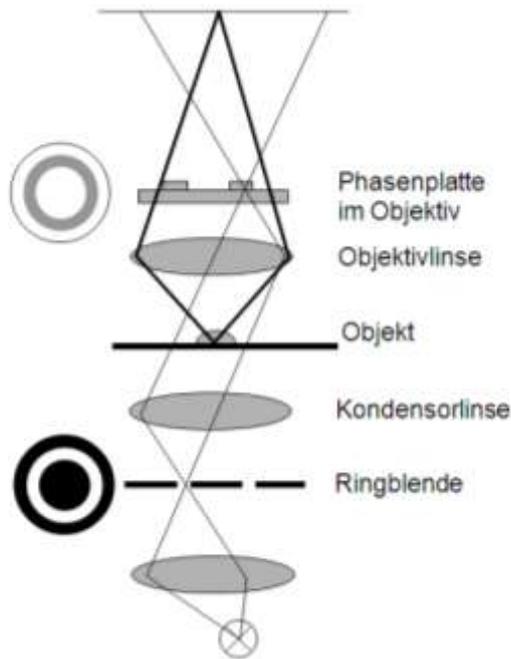
**Können Sie feststellen, wo im Film die Kondensorblende geöffnet oder weitgehend geschlossen ist? Welche Position würden sie als ideal empfinden? Welche Position ist tatsächlich ideal und warum?**

Auch durch leichtes defokussieren lassen sich leichte Kontrastveränderungen erzielen.

Am besten eignet sich jedoch eine spezielle **Phasenkontrast-Optik**. Anstelle der Kondensorblende wird in den Kondensor eine Ringblende eingesetzt.



Abb.: Die Ringblende im ausgebauten Kondensor. Die Kondensorblende muss vollständig geöffnet sein (Der Hebel zeigt nach links unten).

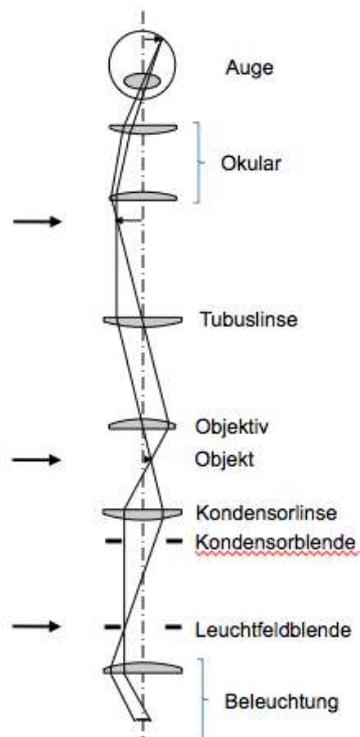


**Abb.:** Strahlengang im Phasenkontrast-Mikroskop

Es kann jetzt nur noch Licht unter einem bestimmten Einfallswinkel das Objekt treffen. Ohne ein Objekt im Strahlengang trifft dieses Licht vollständig auf den Phasenring im Objektiv. Er ist eine dünne ringförmige Metallschicht, die auf eine Phasenplatte im Objektiv aufgedampft ist. Man kann sie schwach erkennen, wenn man bei abgenommenem Okular durch den Tubus des Mikroskops schaut. Der Phasenring verschiebt die Phase der Lichtwelle um  $1/4$  Wellenlänge ( $=90^\circ$ ). Befindet sich nun ein Objekt im Strahlengang, wird Licht teilweise so gestreut, dass es nicht mehr durch den Phasenring läuft. Auch das optisch dichtere Objekt bewirkt eine Phasenverschiebung. Trennen nun in der Bildebene des Objektivs Lichtwellen zusammen, deren Phasen gegeneinander verschoben sind, interferieren die Wellen. Je nach Phasenverschiebung zueinander bis zur Auslöschung (oder Verstärkung). Bei Auslöschung entsteht ein dunkler Kontrast gegenüber dem Untergrund. Es wird im Ergebnis Phasen- in Amplitudeninformation umgewandelt. Bakterien erscheinen meist dunkel vor einem mäßig hellen Hintergrund (positiver Phasenkontrast). Optisch dichtere Einschlüsse (Sporen, Speicherstoff-Granula) erscheinen sehr hell.

#### (4) Das Beleuchtungsverfahren nach Köhler

Mit diesem Verfahren wird die Ausleuchtung durch den Kondensor optimal auf das fokussierte Objekt abgestimmt. Die Überprüfung der Einstellung des Kondensors mithilfe der Köhler-Technik erlaubt es, relativ schnell zu erkennen, ob der Kondensor aus der Optischen Achse des Strahlenganges "herausgerutscht" ist, ob die Höhe des Kondensors richtig ist und damit auch die Kondensorblinde (oder Ringblende) richtig in der Höhe zum Objekt positioniert ist. Das Verfahren ist im Film geschildert: Nach der Fokussierung des Objekts wird die Höhe des Kondensors so verstellt, dass der Rand der Leuchtfeldblende (im Fuß des Mikroskops, die Irisblende sollte so weit wie möglich geschlossen sein) scharf erscheint. Es sind also zwei unterschiedliche Ebenen im Mikroskop scharf abgebildet. Wenn der Lichtfleck der Leuchtfeldblende nicht zentriert ist, sollten die Stellschrauben an dem Kondensor so lange gedreht werden, bis der Lichtfleck der Blende mittig erscheint. Die Blende soll dann nur so weit geöffnet werden, dass die Blendenränder gerade so hinter der Begrenzung des Gesichtsfeldes verschwinden. Die Abbildung zeigt den vereinfachten Strahlengang durch das Mikroskop. Die Pfeile bezeichnen die Ebenen, in denen Objekte gleichzeitig fokussiert (konjugiert) sind: Die Ebene der Leuchtfeldblende, die Objektebene und eine Ebene unterhalb des Okulars - hier können Strichplatten zur Vermessung des Objekts eingebaut werden.



**Abb.:** Strahlengang im gekühlten Mikroskop mit konjugierten Ebenen.